

DOTTORATO DI RICERCA
Fisiologia Applicata e Fisiopatologia

Ciclo XXI

Medicina Interna

**STUDIO DEL MICROCIRCOLO DELLA PARETE GASTRICA
AFFETTA DA PATOLOGIA INFIAMMATORIA E NEOPLASTICA
MEDIANTE COLOR-POWER DOPPLER ED ECOGRAFIA CON
MEZZO DI CONTRASTO ENDOVENOSO**

Presentata da: Milena Micati

Coordinatore Dottorato

Prof. Carlo Franzini

Relatore

Prof. Mauro Bernardi

Esame finale anno 2009

INDICE

INTRODUZIONE	pag 3
SCOPO DELLO STUDIO	pag 20
MATERIALI E METODI	pag 21
Popolazione oggetto dello studio	pag 21
Metodica ecografica	pag 22
RISULTATI	pag 24
Gruppo 1	pag 24
Gruppo 2	pag 25
DISCUSSIONE	pag 29
BIBLIOGRAFIA	pag 37

Introduzione

Lo studio del tratto gastro-enterico costituisce una delle applicazioni più complesse e difficili dell'ecografia addominale; l'assenza di punti di repere anatomici fissi non consente una precisa identificazione topografica del tratto in esame e l'aspetto ecografico di un'ansa intestinale varia ampiamente a seconda del grado di riempimento e della natura del contenuto endoluminale (1). Questi aspetti hanno generato la convinzione che il tubo digerente fosse un distretto inesplorabile dalla metodica ecografica. In particolare, la presenza di meteorismo e la difficoltà metodologica della tecnica hanno determinato la tardiva applicazione dell'ultrasonografia ad un distretto così "ostile". Dal momento che l'aria è un mezzo ad alta impedenza acustica e pertanto poco permeabile al passaggio degli ultrasuoni, lo studio ecografico di un viscere contenente gas risultava del tutto sconsigliabile e l'intestino è stato per lungo tempo considerato una barriera acustica piuttosto che un oggetto di valutazione ecografica. Fino allo scorso decennio, la diagnostica per immagini del tratto gastro-enterico è stata, in effetti, affidata esclusivamente a metodiche radiologiche ed endoscopiche. Tuttavia, i continui sviluppi tecnologici, unitamente alla maggiore esperienza degli operatori, hanno permesso una crescita delle potenzialità diagnostiche dell'ultrasonografia ed una sempre maggiore diffusione di tale metodica nella pratica clinica. In particolare, l'impiego di sonde settoriali e ad alta frequenza ha notevolmente accresciuto la risoluzione dell'immagine ecografica riducendo allo stesso tempo gli ostacoli acustici provenienti dal gas endoluminale; a ciò è seguita l'introduzione di mezzi di contrasto orali (idro-sonografia) (2) e lo

sviluppo di apparecchiature “real time” che hanno migliorato notevolmente lo studio dinamico della peristalsi e della progressione del contenuto luminale. Ancora più di recente, ulteriori progressi sono stati compiuti con l'introduzione della tecnica “contrast harmonic imaging” che consiste nell'amplificazione dell'eco generato dal flusso ematico attraverso l'utilizzo di mezzi di contrasto endovenosi (angioecografia perfusione) (3).

L'insieme di questi avanzamenti tecnologici ha notevolmente migliorato la qualità iconografica conseguibile con l'esame ecografico. Questi risultati, unitamente alle caratteristiche di applicabilità, non invasività, sicurezza, dinamicità e ripetibilità della tecnica ultrasonografica, giustificano ampiamente la progressiva estensione dei campi di applicazione di questa metodica. A tutt'oggi l'ecografia, pur non costituendo un'indagine diagnostica di primo livello nello studio delle malattie delle vie digestive, ha assunto un ruolo di grande rilievo nell'inquadramento clinico delle patologie intestinali, seppur complementare alla radiologia ed all'endoscopia. Le linee guida stabilite congiuntamente tra le tre società italiane di gastroenterologia (AIGO-SIED-SIGE) e la società italiana di Ultrasonologia in Medicina e Biologia (SIUMB) raccomandano l'ecografia addominale in caso di:

- “sintomatologia addominale aspecifica e segni o sintomi d'allarme”
- “dispepsia se associata a segni o sintomi d'allarme”
- “masse addominali palpabili”
- “controindicazioni ad endoscopia o radiologia”.

Il riscontro ecografico di alterazioni morfologiche e/o funzionali del tratto gastro-enterico permette, nella maggior parte dei casi, di ipotizzare una

diagnosi di natura della patologia (flogistica, neoplastica, ischemica...), individuare la sede anatomica interessata da malattia (tratto digestivo superiore, tenue, colon), indirizzare verso ulteriori indagini per escludere o confermare l'ipotesi diagnostica o, nei casi in cui non sia possibile sottoporre il paziente ad esami più invasivi, di formulare una diagnosi di probabilità suggerendo l'iter diagnostico successivo (4).

Laddove l'ecografista individui segni suggestivi di patologia, l'esame ecografico permette, grazie alle sue caratteristiche di dinamicità ed immediatezza d'esecuzione, di allargare lo studio ultrasonografico a tutto l'ambito addominale, per una stadiazione locale e a distanza ed una ricerca di eventuali complicanze (occlusione intestinale, perforazione, fistole, ulcerazioni, fibrosi, stenosi, ascessi, megacolon tossico, ascite, carcinosi peritoneale...), valutazioni tutte eseguibili in tempo reale.

In pazienti affetti da malattia infiammatoria cronica dell'intestino (morbo di Crohn, rettocolite ulcerosa) l'ecografia costituisce indiscutibilmente un valido strumento per valutare il grado di attività della malattia, la risposta al trattamento e lo sviluppo di complicanze locali (5). In centri specializzati, l'ecografia rappresenta, inoltre, una valida guida per l'esecuzione di manovre interventistiche a scopo diagnostico (paracentesi esplorativa, agobiopsia percutanea, citoaspirato) o terapeutico (paracentesi evacuativa, drenaggio di ascessi, alcolizzazione percutanea ed ablazione termica di lesioni focali epatiche).

In considerazione della attuale diffusione dell'ecografia nello studio del tratto gastro-enterico, sempre più frequentemente oggi l'ecografista rappresenta la prima figura medica che individua una condizione patologica. Spesso ciò accade peraltro in occasione di un'indagine di

routine eseguita in assenza di sintomi o segni d'allarme o per altri motivi clinici; il reperto di una condizione morbosa inattesa innesca l'avvio subitaneo di un iter diagnostico mirato ed accelera notevolmente i tempi di conseguimento di una diagnosi definitiva e quindi di provvedimento terapeutico.

Gli elementi che permettono all'operatore di ipotizzare l'esistenza di una condizione morbosa sono molteplici e richiedono una valutazione d'insieme strettamente integrata alla storia clinica del paziente.

Lo studio ecografico del tubo digerente richiede un digiuno di almeno 8 ore e si basa sulla valutazione, con sonde convex (da 3.5- 5 MHz) e lineari (da 5-10 MHz), dei seguenti parametri, osservati mediante scansioni sagittali, coronali ed oblique:

1. *parete intestinale*: spessore, ecostruttura, stratificazione, margini.
2. *lume*: virtuale, comprimibile, centrale/eccentrico, disteso/stenotico.
3. *peristalsi*: conservata, torpida/vivace, assente.
4. *raccordo con i tratti intestinali a monte e a valle*: graduale/brusco.

In condizioni fisiologiche, lo spessore della parete gastrica varia dai 2 ai 6 mm in rapporto alle diverse fasi funzionali; i restanti tratti del tubo digerente hanno uno spessore di parete inferiore ai 3 mm (6).

Valore patologico

AUTORI	Spessore parietale
Di Candio et al.(1986) Sheridan et al.(1993)	≥5mm
Brignola et al.(1993) Worticek et al.(1987) Schwerk et al.(1992) Maconi et al. (1996) Hata et al. (1994)	≥4mm
Lim et al. (1994) Solvig et al.(1995) Van Oostayen et al.(1997) Gasche et al.(1999) Arienti et al.(1996)	≥3mm

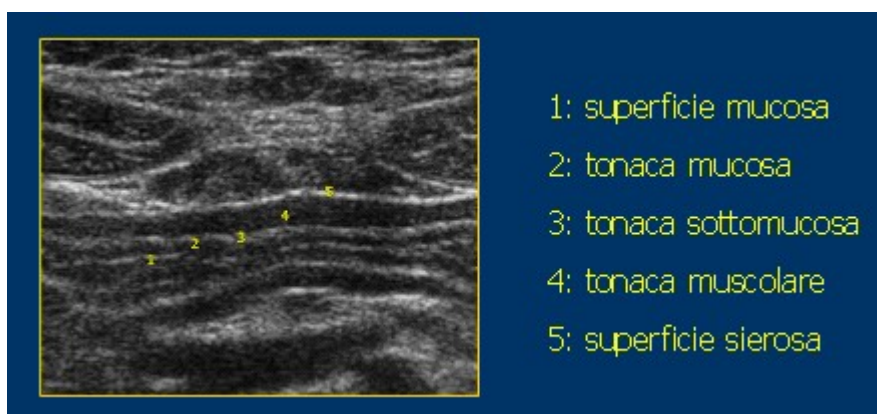
- 3 mm sens-spec 88-93%
- 4 mm sens-spec 75-97%

Fragelli M, Radiology 2005

L'ecostruttura di una parete normale è caratterizzata da una successione di 5 strati a differente ecogenicità, alternativamente iper- ed ipo-ecogeni:

1. *superficie mucosa*: iperecogena;
2. *tonaca mucosa*: ipoecogena;
3. *tonaca sottomucosa*: iperecogena;
4. *tonaca muscolare*: ipoecogena;
5. *superficie sierosa o interfaccia tra pareti e spazi perviscerali*:

iperecogena.



Sempre in riferimento a condizioni fisiologiche, i margini delle anse intestinali, valutati secondo il loro asse maggiore, risultano regolari, la peristalsi valida e la successione dei segmenti intestinali appare dolce ed

armoniosa, senza bruschi cambiamenti di spessore parietale, di calibro del viscere o di conformazione del lume.

La valutazione d'insieme di questi elementi permette all'ecografista di riconoscere immagini discordanti da quadri normali e suggestivi di una condizione morbosa.

Le alterazioni patologiche si presentano ecograficamente come come un ispessimento, focale o circonferenziale, della parete intestinale, associato ad irregolarità e discontinuità degli echi provenienti dal viscere e ad anomalie della peristalsi. Il segno ecografico dell'ispessimento parietale, seppur altamente sensibile di patologia, risulta scarsamente specifico in quanto comune a varie condizioni anatomo-patologiche (7).

▪ Morbo di Crohn	▪ Vasculite
▪ Colite ulcerosa	▪ Tumori
▪ Coliti (non IBD)	▪ primitivi/metastatici
▪ Tubercolosi	▪ linfoma/sarcoma
▪ Actinomicosi	▪ carcinoidi
▪ Amiloidosi	▪ Edema parete intestinale
▪ Diverticolite	

La valutazione strutturale della parete ispessita, specie se effettuata con sonde ad alta definizione, mirata allo studio degli strati parietali, consente spesso un orientamento sulla natura della lesione e, sebbene i reperti non siano del tutto specifici, permette in molti casi di differenziare tra lesioni infiammatorie e neoplastiche.

flogosi		neoplasia
Ileo/colon retto	sede	Colon retto
ispessita	parete	ispessita
ipoecogena	ecostruttura di parete	ipoecogena
si	stratificazione	no
graduale	raccordo	brusco
centrale	lume	eccentrico
regolari	margin	irregolari

L'aspetto ecografico tipico di un'ansa intestinale infiammata osservata in scansione trasversale interessata da flogosi è definito “a bersaglio” o “a coccarda”; con questa definizione ci si riferisce ad una immagine ad anello, nel cui contesto è possibile distinguere un'area centrale iperecogena (corrispondente al lume) ed una corona periferica ipoecogena ecostratificata (corrispondente alla parete dell'ansa) (Fig 1) (8).

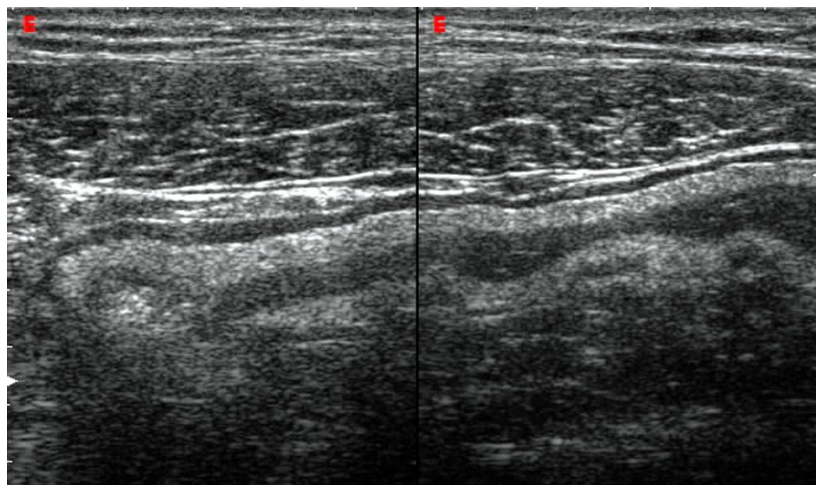


Fig 1. Morbo di Crohn. Ansa “a coccarda”, con anello periferico stratificato (parete ispessita) e centro iperecogeno (lume).

La neoplasia intestinale, in particolare quella maligna, si presenta ecograficamente come una massa o come un ispessimento focale della parete. L'aspetto ecografico riflette in qualche modo il tipo di crescita della neoplasia: stenosante, infiltrante o vegetante. Le forme neoplastiche a prevalente sviluppo endoluminale sono visualizzate raramente, in quanto spesso celate dal contenuto gassoso del lume; i tumori a prevalente

sviluppo extraparietale, stenosanti ed infiltranti (adenocarcinomi, tumori miogenici, linfomi) si configurano, all'ecografia, come masse solide ad ecogenicità variabile, quasi sempre disomogenei, con contorni scarsamente definiti.

L'aspetto di più frequente riscontro è quello di un'area iperecogena centrale (corrispondente al contenuto aereo del lume, irregolare e distorto) circoscritto da una corona di spessore variabile e non necessariamente uniforme, ad ecostruttura ipoecogena o disomogenea, priva della normale stratificazione ed a profili irregolari (corrispondente alla parete infiltrata dal neoplasia). Tali segni ecografici configurano un quadro iconografico noto con il termine di "pseudo-kidney", denominazione volta ad indicare la somiglianza di tale immagine con l'aspetto ecografico di un rene normale (Fig 2-3).

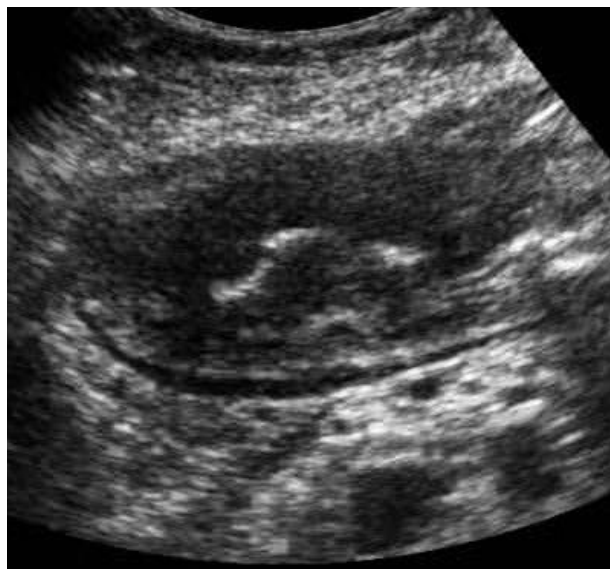


Fig 2. Adenocarcinoma gastrico. Aspetto a "pseudo-kidney": la parete gastrica appare ispessita, ipoecogena e non stratificata; al centro il lume, iperecogeno, risulta stenotico.



Fig 3. Adenocarcinoma del colon ascendente. L'immagine a "pseudo-kidney" rassomiglia a quella prodotta da un rene normale

Ma se sono a tutt'oggi noti i segni ecografici indicatori di malattia intestinale e suggestivi di flogosi o neoplasia, poco definite sono le alterazioni della vascolarizzazione di parete nell'ambito di tali patologie.

Lo studio ecografico della vascolarizzazione di un organo si esegue per mezzo della tecnica Color-Power-Doppler: questa metodica analizza le differenze di frequenza e fase del segnale Doppler, fornendo informazioni sulla velocità e direzione del flusso. Convenzionalmente, il flusso viene rappresentato in rosso quando è in avvicinamento rispetto alla sonda ed in blu quando si allontana da essa.

L'utilizzo del Color-Power-Doppler consente di localizzare strutture vascolari di piccole dimensioni e flussi a velocità inferiore a 1 mm/sec, nonché di individuare eventuali alterazioni di flusso, suggestive di ischemia o ipervascularizzazione di un'ansa intestinale.

L'analisi spettrale dei segnali Doppler permette di ottenere informazioni sia quantitative sulle velocità di flusso e sulla portata dei vasi esplorati che semiquantitative sulle resistenze (indice di resistenza IR, indice di

pulsatilità IP) e sulle caratteristiche del flusso a monte del vaso in cui si effettua il campionamento (Fig 4) (9).

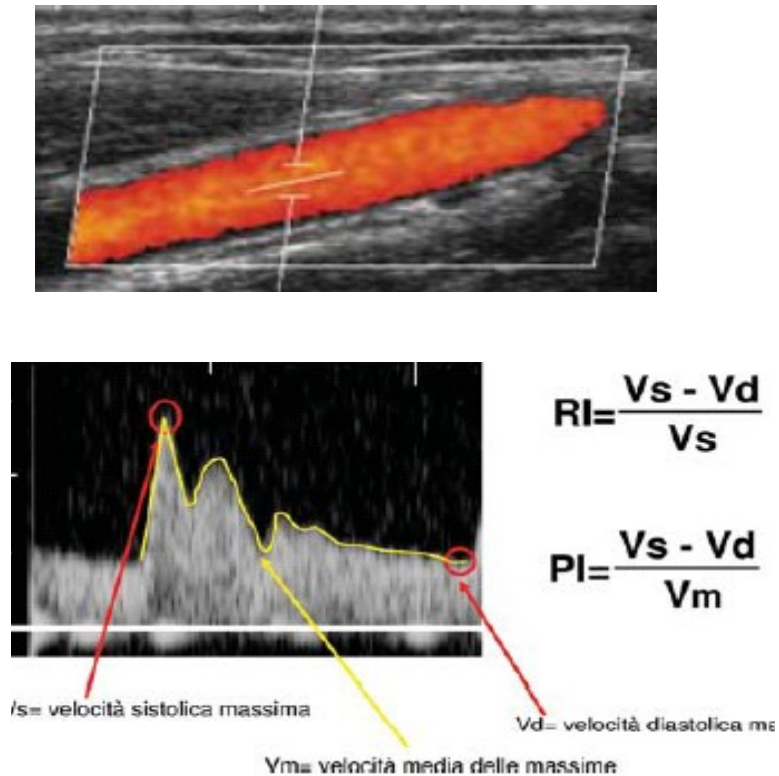


Fig 4. Analisi spettrale di un vaso arterioso e calcolo dell'IR e dell'IP.

Lo studio Doppler fornisce elementi di grande rilevanza diagnostica ma finora è stato impiegato prevalentemente per caratterizzare le alterazioni della vascolarizzazione di parete nella patologia infiammatoria. In questo ambito, le anse intestinali risultano omogeneamente ipervascolarizzate. In particolare, nei pazienti con morbo di Crohn è stato evidenziato un aumento del flusso arterioso nell'arteria mesenterica superiore e del flusso venoso nella vena porta, con riduzione degli indici di resistenza arteriosi mesenterici (10). Tali alterazioni flussimetriche correlano con l'attività di malattia. Numerosi studi hanno inoltre documentato la correlazione tra presenza di segnali vascolari a carico della parete ispessita e malattia di Crohn attiva. Spalinger ha quantificato l'entità della vascolarizzazione di

parete contando il numero di pixel colore per cm quadro di area di tessuto in esame ed ha rivelato una correlazione statisticamente significativa tra densità dei vasi ed attività della malattia (Fig 5) (11).

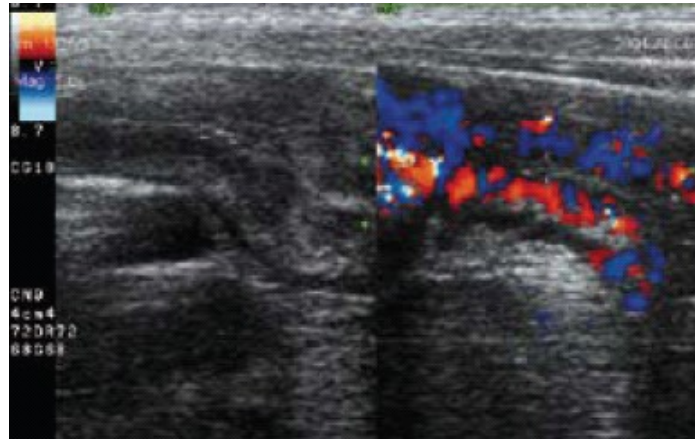


Fig 5. Morbo di Crohn in fase di attività. Ispessimento parietale ed iperemia di un'ansa intestinale.

Secondo quanto descritto nello studio di Esteban, indici di resistenza dei vasi intraparietali < 0.75 correlano con l'attività di malattia (12).

Ulteriori studi hanno dimostrato l'utilità dello studio Doppler nella diagnosi di volvolo, appendicite acuta, ischemia intestinale e morbo celiaco (13-16).

Meno numerosi sono gli studi disponibili in Letteratura riguardo agli aspetti Doppler del microcircolo delle neoplasie intestinali. Chen et al hanno descritto correlazioni significative tra l'indice di vascolarizzazione della parete del colon affetta da adenocarcinoma (rapporto tra il numero di pixel colore per area di tessuto studiata e numero totale di pixel di quella stessa area) ed il rischio di metastasi linfonodale, invasione vascolare e metastasi a distanza (17). Sempre lo stesso Autore, in uno studio più recente, ha individuato correlazioni significative tra intensità del segnale vascolare di parete gastrica affetta adenocarcinoma, grado di invasione vascolare e variante istologica della neoplasia; pertanto questo parametro

rappresenterebbe pertanto un indice di neoangiogenesi tumorale ed un fattore prognostico negativo indipendente, inversamente correlato alla sopravvivenza dei pazienti (18).

Table 4. CLINICOPATHOLOGIC FACTORS AFFECTING OVERALL SURVIVAL RATE DETERMINED BY COX PROPORTIONAL HAZARD MODEL IN STAGE III PATIENTS				
Variable	B	S.E.	Exp (β)	Sig
MVD	0.6803	0.6785	1.9746	0.316
≤ 34 : >34				
CDVI (%)	1.353	0.6671	3.8692	0.0425
≤ 11 : >11				
Vascular invasion	1.5349	0.6882	4.6409	0.0257
Negative:positive				
B, β regression coefficient; SE, standard error; Sig, significance; Exp (β), exponent β .				

Fig 6. Chen et al. Ann Surg 2002

Occorre tuttavia considerare che la valutazione di flusso con l'eco-color-power Doppler è sempre dipendente da fattori tecnici, come l'impiego di guadagni corretti, di una giusta angolazione del trasduttore, dal livello di profondità dell'ansa in esame e dall'esperienza dell'operatore.

Il Doppler, peraltro, è in grado di valutare soltanto vasi di calibro superiore ai 100 μm (19) e non è in grado di individuare i vasi neoangiogenetici, di calibro ben inferiore, che caratterizzano un tessuto neoplastico. Questo è anche il motivo per cui sono pochi i lavori che hanno valutato con la metodica Doppler le alterazioni della vascolarizzazione di parete nelle neoplasie intestinali.

L'introduzione dei mezzi di contrasto endovenosi ecografici ha ottimizzato lo studio del microcircolo permettendo la visualizzazione di vasi di calibro inferiore ai 20 μm (20).

I mezzi di contrasto per ecografia sono costituiti da soluzioni acquose isotoniche di microbolle gassose di diametro inferiore a quello dei globuli rossi, stabilizzate da membrane fosfolipidiche (3).

I mezzi di contrasto di prima generazione contenevano aria, quelli di seconda generazione sono costituiti da esafluoruro di zolfo (Fig 7).



Fig 7. Struttura di una microbolla di seconda generazione: SonoVue® (Bracco)

Una volta iniettate in circolo, le microbolle riflettono il segnale ecografico incidente come se fossero globuli rossi, amplificando il segnale ultrasonografico proveniente dal letto vascolare, potenziando la visualizzazione del microcircolo. Peraltro, grazie al loro ingombro sterico, i mezzi di contrasto ecografici non sono in grado di diffondere attraverso le fenestrazioni dell'epitelio vascolare e rimangono perciò confinati all'interno del circolo ematico; per questa loro caratteristica vengono detti agenti "blood-pool" (Fig 8).

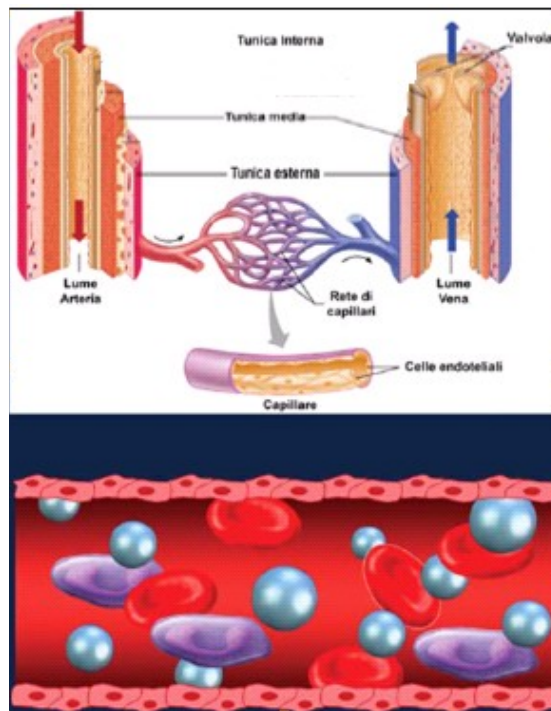


Fig 8. Le microbolle sono mezzi di contrasto intravascolari “blood-pool” capaci di visualizzare il microcircolo.

Amplificando il rapporto segnale-rumore del sangue, i mezzi di contrasto ecografici “blood-pool” si rendono particolarmente idonei allo studio di malattie caratterizzate da alterazioni del microcircolo, quali iperemia, neoangiogenesi o ischemia (Fig 9).

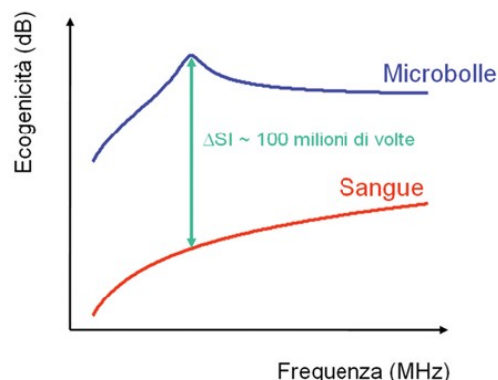


Fig 9. Incremento dell'intensità di segnale (in decibel) del sangue dopo somministrazione di mezzo di contrasto ecografico endovenoso.

Anche i tessuti, una volta colpiti, producono onde acustiche di ritorno (imaging armonico tissutale) generate dalla distorsione del fascio ultrasonoro incidente secondaria all'attraversamento dei tessuti; ma le eco

prodotte dai tessuti sono più deboli di quelle generate dalle microbolle e impiegando piattaforme dedicate è possibile distinguerle sia dalla frequenza fondamentale che dalle armoniche generate dalle microbolle (Fig 10).



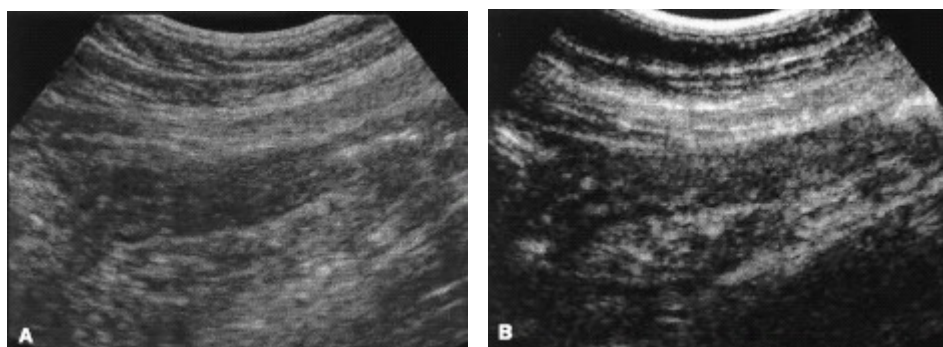
Fig 10. Risposta armonica di un mezzo di contrasto di seconda generazione (SonoVue®, Bracco) rispetto alla risposta armonica tissutale al variare della pressione acustica applicata.

Una volta iniettato nella vena brachiale, il mezzo di contrasto si distribuisce ai tessuti in 10-15 secondi; dopo tre minuti il mezzo di contrasto è stato completamente eliminato e non è più rintracciabile in circolo. Rispetto ai mezzi di contrasto radiologici, quelli ecografici sono più sicuri, si usano in quantità inferiore e permettono uno studio della vascolarizzazione in tempo reale senza esporre il paziente a radiazioni.

I mezzi di contrasto intravascolari possono essere utili quando il segnale Doppler a livello del vaso in esame è troppo debole. Il miglioramento del segnale prodotto dai mezzi di contrasto può permettere di differenziare tra microcircolo normale e quello derivante da neoangiogenesi tumorale. La vascolarizzazione dei tumori è differente da quella dei tessuti normali ed è di difficile individuazione poiché costituita da vasi distorti e irregolari caratterizzati da flussi esigui e lenti (21).

Finora la maggiore applicazione dell'angioecografia perfusionale è stata in ambito epatologico: nella caratterizzazione delle lesioni focali epatiche l'ecografia con mezzo di contrasto intravascolare presenta un'accuratezza diagnostica paragonabile a quella della TC e della RM (22).

Solo di recente l'ecografia con mezzo di contrasto è stata impiegata per lo studio delle alterazioni del microcircolo della parete intestinale in pazienti affetti da morbo di Crohn. Alcuni studi hanno documentato che l'impiego di mezzi di contrasto di prima generazione migliora l'accuratezza diagnostica ecografica nella valutazione della attività del morbo di Crohn. Di Sabatino et al hanno dimostrato una sensibilità della metodica del 96.7 % ed una specificità del 100% nella valutazione dell'attività della malattia (23); nello studio di Rapaccini la sensibilità nell'identificazione di Crohn attivi aumentava dal 45% al 98% dopo infusione del mezzo di contrasto di prima generazione (24). Sono ancora limitati i dati sul ruolo dell'ecografia con sostanze di seconda generazione nello studio dell'attività in pazienti con malattia di Crohn. Serra et al, in uno studio preliminare condotto con impiego di SonoVue[®], hanno evidenziato correlazioni statisticamente significative tra alcuni pattern di impregnazione contrastografica e grado di attività della malattia: secondo questo studio, alcuni pattern correlavano con malattia attiva ed altri pattern con stenosi cicatriziale (Fig 11) (25).



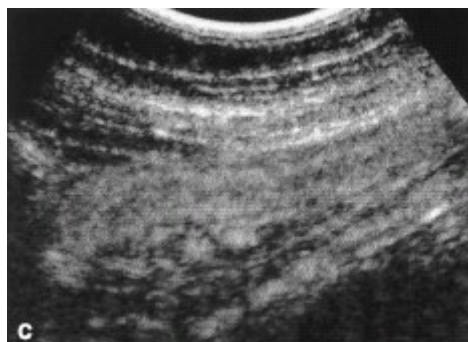


Fig 11. Morbo di Crohn attivo. A) ecografia B-Mode: ispessimento parietale; B) impregnazione contrastografica a 10 secondi; C) impregnazione contrastografica a 30 secondi.

Più di recente, Robotti et al hanno evidenziato una buona correlazione tra presenza di enhancement parietale in pazienti in remissione clinica e laboratoristica e rischio di recidiva precoce di malattia (26).

Se tali risultati venissero confermati da altri lavori, l'angioecografia perfusionale acquisterebbe un ruolo fondamentale nella valutazione della risposta alla terapia medica e nel follow-up di malattia.

Le alterazioni della vascolarizzazione delle pareti del tratto gastroenterico affette da neoplasia sono state valutate, come sopra detto, mediante la metodica Doppler e pertanto limitatamente al macrocircolo. Nonostante i limiti di tale tecnica, i risultati ottenuti suggerivano l'esistenza di correlazioni significative tra grado di vascolarizzazione ed aggressività di malattia (17-18). Non sono invece a tutt'oggi noti i pattern di impregnazione ecocontrastografica delle neoplasie del tratto gastroenterico.

Scopo dello studio

Scopo del presente studio è quello di descrivere le modalità di distribuzione dei segnali vascolari rilevabili con tecnica Doppler ed il comportamento contrastografico, valutato con angioecografia perfusionale, della parete gastrica di pazienti affetti da gastrite acuta o adenocarcinoma gastrico, al fine di evidenziare elementi utili per una diagnosi differenziale ecografica ed una eventuale previsione prognostica.

Materiali e metodi

Popolazione oggetto dello studio

Sono stati arruolati 20 soggetti (14M/6F, età media 52.9 anni) di cui 10 (gruppo 1) affetti da gastrite acuta e 10 (gruppo 2) da adenocarcinoma gastrico.

In entrambi i gruppi la diagnosi è stata posta con esame endoscopico ed istologico, come di seguito riportato.

Gruppo 1

Sette pazienti su 10 risultavano all'esame endoscopico affetti da gastrite acuta antrale; all'esame istologico 4 di questi pazienti presentavano un quadro di gastrite congestivo-emorragica e 3 una condizione di gastrite erosivo-emorragica. Nei restanti 3 pazienti l'endoscopia documentava una condizione di gastrite acuta erosiva diffusa all'antro e al corpo; l'esame istologico mostrava un quadro di danno cellulare, essudazione di plimorfonucleati neutrofili, prominenza dell'epitelio foveolare e riduzione della mucosecrezione superficiale.

L'eziologia delle gastriti acute era così distribuita: in 4 Pazienti portatori di gastrite congestivo-emorragica il danno era secondario ad assunzione di FANS; 3 gastriti erosivo-emorragiche erano conseguenti ad assunzione di alcool; 3 gastriti acute erosive dell'antro-corpo erano sostenute da infezione da *Helicobacter pylorii*.

Gruppo 2

L'esame endoscopico documentava, in 6 pazienti, una deformazione della parete antrale, con aumento di consistenza della stessa, ulcerata in un caso. L'esame istologico di questi pazienti documentava in 3 casi una

condizione di adenocarcinoma scarsamente differenziato e 3 casi di adenocarcinoma infiltrante ulcerato. Tre pazienti presentavano all'esame endoscopico una perdita di distensione della regione pilorica, che appariva substenotica, di consistenza aumentata e lesionata per la presenza di ulcera a bordi duri. L'esame istologico dimostrava in questi casi una condizione di adenocarcinoma infiltrante. Un solo paziente presentava all'endoscopia un ispessimento focale di un tratto di parete del corpo gastrico; la biopsia di tale area risultava diagnostica per carcinoma microghiandolare.

	sede endoscopica	istologia
Gruppo 1	7 antro	<ul style="list-style-type: none"> 4 congestivo-emorragiche 3 erosivo-emorragiche
	3 antro-corpo	<ul style="list-style-type: none"> 3 erosive
Gruppo 2	6 antro	<ul style="list-style-type: none"> 3 adenoca. scarsamente differenziati 3 adenoca. infiltranti-ulcerati
	3 piloro	<ul style="list-style-type: none"> 3 adenoca. infiltranti-ulcerati
	1 corpo	<ul style="list-style-type: none"> 1 ca. microghiandolare

Metodica ecografica

Dopo 8 ore di digiuno, i pazienti di entrambi i gruppi sono stati sottoposti ad ecografia trans-addominale B-mode integrata da studio Color-Power-Doppler.

Gli esami sono stati condotti dallo stesso operatore utilizzando l'ecografo Technos MPX® provvisto di tecnologia specifica di contrast real-time imaging (Esaote). Sono state utilizzate sonde convex (da 3.5- 5 MHz) e lineari (da 5-10 MHz). Lo stomaco è stato facilmente individuato in tutti i casi eseguendo scansioni assiali, oblique e sagittali condotte in ipocondrio

sinistro ed in epigastrio; una volta visualizzato, sono stati valutati i seguenti parametri:

- *spessore della parete;*
- *ecostruttura ed ecostratificazione parietale;*
- *presenza, intensità e distribuzione dei segnali vascolari intraparietali.*

Previo posizionamento di un catetere venoso nella vena brachiale sinistra, sono stati iniettati in bolo 2.4 ml di esafluoruro di zolfo (SonoVue[®], Bracco) ricostituiti con 10 cc di soluzione fisiologica, secondo le indicazioni della ditta produttrice. L'insonazione è stata mantenuta il più possibile fissa sul tratto di parete gastrico ispessito per tutta la durata dell'esame, 3 minuti, durante i quali sono stati osservati la sede, le modalità (intensità, omogeneità/disomogeneità, distribuzione) ed i tempi di impregnazione e dismissione del mezzo di contrasto. Per ogni esame angioecografico è stato registrato un video che ha ricoperto tutta la durata dell'esame. L'esame angioecografico è stato condotto dallo stesso operatore che aveva eseguito l'esame B-mode e Doppler ed è stata impiegata la stessa strumentazione.

Vista la bassa numerosità della popolazione studiata, non sono state eseguite analisi statistiche dei dati raccolti, che sono di seguito esposti unicamente in maniera descrittiva.

Risultati

Gruppo 1

Tutti i pazienti affetti da gastrite acuta presentavano all'esame ecografico B-mode uno spessore di parete superiore a 5 mm (media 8.7 mm). In tutti i casi osservati la stratificazione intraparietale era ben riconoscibile (Fig 12).

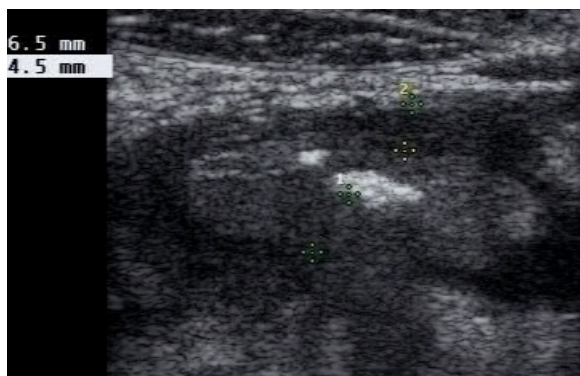


Fig 12. Gastrite acuta: parete gastrica ispessita e stratificata.

Azionata la funzione Doppler, si è osservata una scarsa ed omogenea distribuzione dei segnali vascolari lungo la parete ispessita in 9 casi su 10 (Fig 13). In un solo paziente è stata riscontrata una ricca distribuzione dei segnali vascolari.

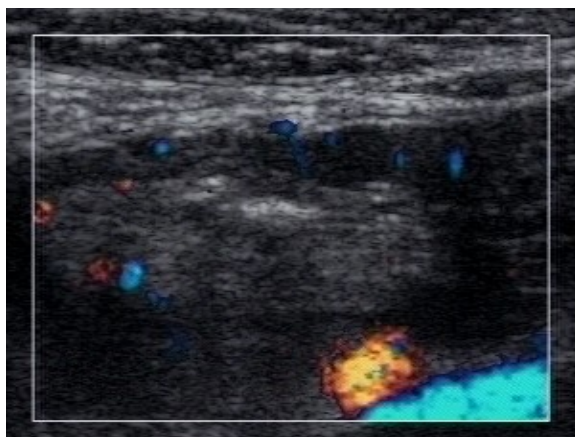


Fig 13. Gastrite acuta. Omogenea distribuzione dei segnali vascolari.

Dopo infusione di SonoVue, si è osservata in tutti i pazienti una rapida (in media entro 15 secondi), intensa ed omogenea impregnazione del mezzo di contrasto attraverso la parete gastrica. In 8 pazienti, la distribuzione del

mezzo di contrasto si è mantenuta tale per tutta la durata dell'esame (pattern 1) (Fig 14). In 2 casi su 10 si è assistito ad una lenta ed omogenea dismissione del mezzo di contrasto (pattern 2).

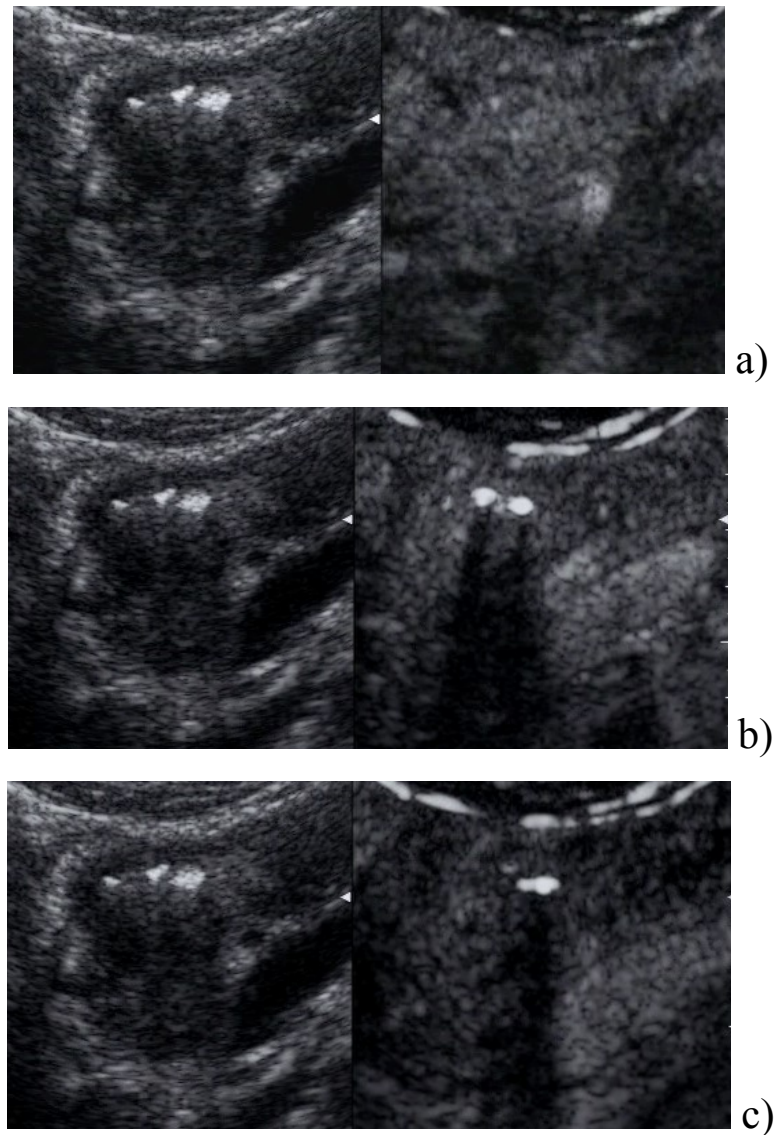


Fig 14. Pattern 1. Impregnazione omogenea a 10 secondi (a), 30 secondi (b) e tre minuti (c).

Gruppo 2

In tutti i pazienti affetti da adenocarcinoma gastrico lo spessore della parete gastrica risultava, all'esame ecografico B-mode, aumentato (media 11.2 mm), con mancata visualizzazione della stratificazione di parete (Fig 15).



Fig 15. Adenocarcinoma gastrico. Pareti dello stomaco ispessite ed ipoecogene.

Al Color-Power-Doppler, i pixel colore risultavano intensi e concentrati in aree focali in 8 soggetti; nei restanti 2 casi è stata osservata una intensa ed omogenea distribuzione dei segnali vascolari lungo la parete ispessita (Fig 16-17).



Fig 16. Adenoca. gastrico. Distribuzione focale dei segnali Doppler nell'area di maggiore ispessimento parietale.



Fig 17. Adenoca. gastrico. Intensa e disomogenea distribuzione dei segnali vascolari.

Dopo infusione di SonoVue, si è osservata in tutti i pazienti una precoce (in media entro 12 secondi) ed intensa impregnazione del mezzo di contrasto. In 6 pazienti il SonoVue appariva disomogeneamente distribuito lungo la parete gastrica. Nei restanti 4, l'impregnazione contrastografica appariva omogenea. In 7 casi, è seguita una rapida (in media entro 29 secondi) dismissione del mezzo di contrasto (pattern 3) (Fig 18); nei restanti 3 casi osservati, si è verificata un lento e disomogeneo esaurimento del SonoVue (pattern 4).

	GASTRITE ACUTA	ADENOCARCINOMA
Parete	> 5 mm (10/10); media 8,7	> 5 mm (10/10); media 11,2
stratificazione	conservata (10/10)	non riconoscibile (10/10)
C-PO	scarsa e omogenea distribuzione dei segnali (9/10)	intensa e disomogenea distribuzione dei segnali (8/10)
CEUS	Impregnazione rapida, intensa ed omogenea (10/10) <ul style="list-style-type: none"> • prolungata (8/10) • lento wash out (2/10) 	impregnazione precoce ed intensa (10/10) <ul style="list-style-type: none"> • rapido wash out (7/10) • lento e disomogeneo wash out (3/10)

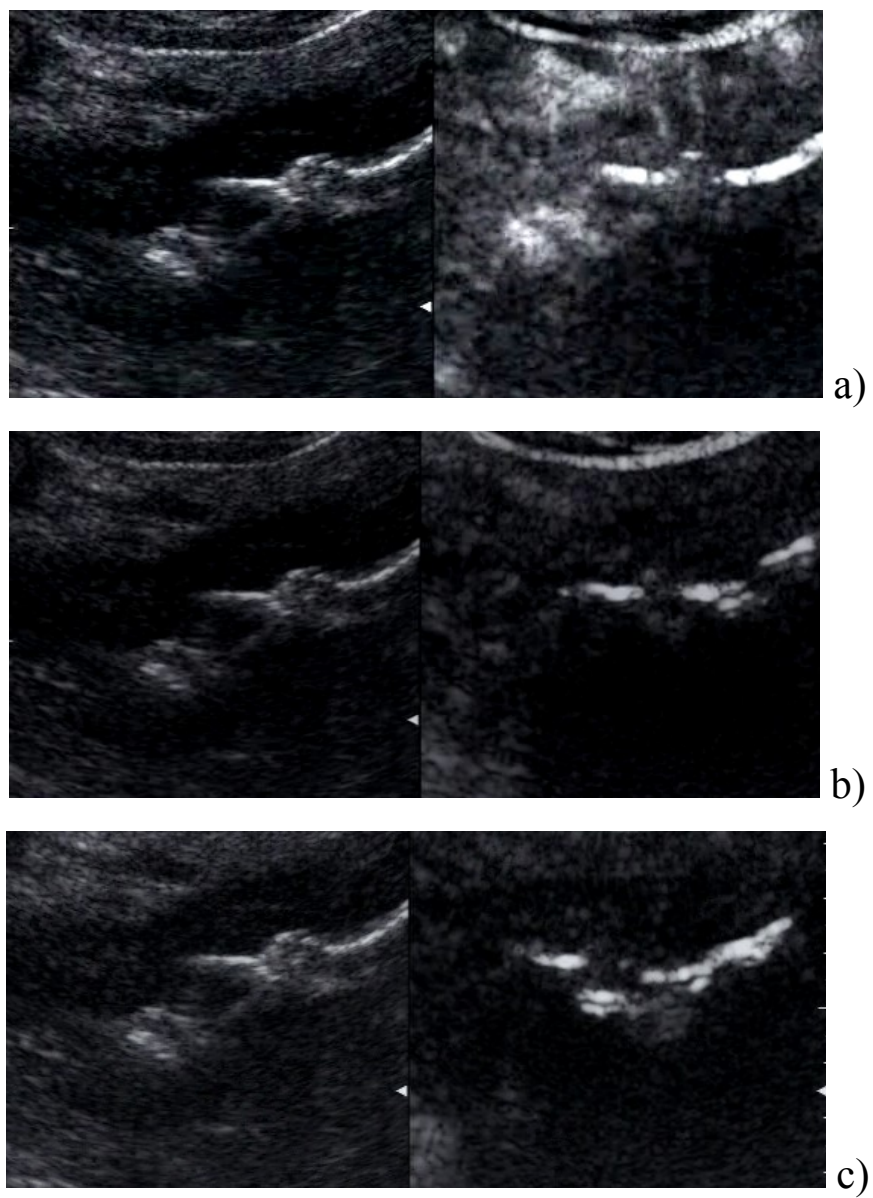


Fig 18. Pattern 3. Impregnazione rapida a 10 secondi (a), completa dismissione del mezzo di contrasto a 30 secondi (b) e a tre minuti (c).

Discussione

Oggigiorno, la parete intestinale può essere ben indagata mediante ecografia transaddominale. Dai lavori pubblicati in merito, emerge che lo spessore della parete del tubo digerente può variare da 2 ai 6 mm (6, 7, 27). Rilievi al di sopra dei suddetti valori indicano una condizione patologica. Purtroppo il segno ecografico di ispessimento parietale è comune ad una vasta gamma di condizioni morbose e la diagnosi differenziale è spesso difficoltosa. Pertanto, informazioni ulteriori, quali le caratteristiche della vascolarizzazione di parete, possono costituire utili elementi di aiuto al corretto inquadramento diagnostico.

Le sonde ad alta frequenza permettono la visualizzazione di 5 strati intraparietali, corrispondenti alla successione delle tonache che costituiscono la parete intestinale. I vasi si collocano nella sottomucosa ed attraversano la muscolaris propria. Il Color-Power Doppler si è dimostrato utile nella pratica clinica nello studio delle alterazioni di vascolarizzazione in alcune malattie gastro-intestinali, come sopra ricordato (28-29). L'infiammazione acuta o cronica della parete intestinale si accompagna ad aumento del flusso mesenteriale ed intraparietale (11-12), mentre nelle condizioni di ischemia si riscontra una ipoperfusione delle arterie mesenteriche e della parete intestinale (30). Pochi sono gli studi che descrivono gli aspetti Doppler delle lesioni neoplastiche. Ciò è dovuto principalmente al fatto che i microvasi provenienti dalla neoangiogenesi tumorale sono difficilmente riconoscibili da questa metodica a causa delle loro piccole dimensioni e del basso flusso ematico vigente (31).

Come sopra menzionato, Chen ha individuato correlazioni significative tra l'indice di vascolarizzazione di parete e rischio di metastasi linfonodale, di invasione vascolare e di metastasi a distanza (17). Sempre lo stesso Autore, in uno studio più recente, ha individuato correlazioni significative tra intensità del segnale vascolare parietale nel cancro gastrico e grado di invasione vascolare e variante istologica della neoplasia (18). Kawasaki ha valutato le alterazioni della vascolarizzazione della parete gastrica di pazienti affetti da adenocarcinoma e gastrite: i risultati del suo lavoro indicavano un aumento della vascolarizzazione nel segmento affetto da patologia rispetto alla parete sana circostante nei primi ed una uguale distribuzione dei segnali vascolari nei secondi (32). Schilling ha valutato, con laser Doppler flussimetria per approccio endoscopico, le alterazioni del microcircolo della parete gastrica di pazienti affetti da adenocarcinoma e ha rilevato che la vascolarizzazione del cancro gastrico è costituita quasi esclusivamente da capillari, prevalenti alla periferia del tumore (33).

Tuttavia non è possibile eseguire con la sola tecnica Doppler una corretta valutazione delle alterazioni della vascolarizzazione della parete gastrica neoplastica dal momento che questa metodica non visualizza piccoli vasi e neocapillari provenienti dalla neoangiogenesi tumorale.

La crescita tumorale dipende dallo sviluppo di vasi neoangiogenetici. Tale processo consiste in un rimodellamento della matrice extracellulare, proliferazione di cellule endoteliali, differenziazione di capillari e successiva organizzazione di anastomosi. Fattori secreti dal tumore (polipeptide growth factor, ossido nitrico, epafarina ed adenosina) promuovono tali eventi (34). I vasi neoangiogenetici tumorali sono capillari, privi di periciti e cellule muscolari lisce (35) e dispongono di

un'autoregolazione che sfugge ai noti meccanismi fisiologici. Il grado di neoangiogenesi correla non solo con la crescita tumorale ma anche con il potenziale metastatico della neoplasia. L'entità della vascolarizzazione delle neoplasie maligne correla con il loro potenziale invasivo e la densità vascolare rappresenta un fattore prognostico indipendente in numerose neoplasie. L'attenzione dei ricercatori si è di recente rivolta alla elaborazione di strategie antiangiogenetiche (36). TC con mezzo di contrasto e RM sono metodiche in grado di determinare la vascolarizzazione di un tessuto; rispetto a queste, l'ecografia presenta i vantaggi di maggiore sicurezza. Il Doppler riconosce il flusso ematico in vasi di piccolo calibro e tali rilevazioni possono essere quantificate utilizzando sistemi computerizzati (37). Recenti lavori hanno dimostrato come tale metodica possa riconoscere la riduzione della vascolarizzazione intratumorale dopo terapia antiangiogenetica (38). Tuttavia, l'esatta valutazione della perfusione di un tessuto (intesa come flusso ematico per unità tissutale) richiede il computo del flusso capillare. La difficoltà di reperire il flusso capillare aumenta in ambito neoplastico a causa della irregolarità dei piccoli vasi neoangiogenetici. Convenzionalmente il Doppler non è in grado di visualizzare il flusso capillare. Alcuni studi Autori hanno confrontato la "densità vascolare" rilevata con tecnica Doppler con quella risultante da valutazioni istologiche e la correlazione tra questi parametri risultava scarsa in tutti i lavori a causa del mancato riconoscimento dei piccoli vasi e dei microvasi. Questi ultimi sono per lo più prevalenti nelle aree centrali della neoplasia (37).

I recenti progressi nella strumentazione ecografica e l'avvento dei mezzi di contrasto ecografici hanno permesso notevoli avanzamenti delle

potenzialità diagnostiche perseguibili con l'ultrasonografia. In particolare, hanno potenziato la visualizzazione del microcircolo, persino in organi tradizionalmente di difficile investigazione, quali il tratto gastro-enterico. L'angioecografia perfusionale consente il rilievo di flussi ematici in vasi di calibro inferiore ai 20 μm . Krix et al hanno comparato la metodica Doppler e l'angioecografia perfusionale nella determinazione dell'entità di vascolarizzazione di tumori animali ed hanno evidenziato la maggiore attendibilità dell'angioecografia rispetto al Doppler convenzionale. Lo stesso Autore, impiegando ecografia con mezzo di contrasto endovenoso di prima generazione, ha descritto una riduzione della perfusione vascolare e del flusso ematico di tumori umani impiantati in cavie dopo terapia antiangiogenetica e ha evidenziato correlazioni significative tra "densità vascolare" percepita da questa metodica e densità vascolare risultante da esame istologico (31).

Sono disponibili in Letteratura alcuni studi che riportano le caratteristiche contrastografiche della parete gastrica o intestinale interessata da malattia infiammatoria. Kuzuya ha osservato la distribuzione del Levovist lungo la parete gastrica di un paziente affetto da malattia di Menetrier ed ha riscontrato, come atteso secondo la fisiopatologia di tale malattia, una impregnazione del mezzo di contrasto limitatamente allo strato 2 della parete gastrica, corrispondente alla tonaca mucosa (39).

A nostra conoscenza, sono disponibili in Letteratura solo due studi riguardo allo studio delle neoplasie gastro-enteriche con angioecografia perfusionale. Tali lavori sono stati condotti usando mezzi di contrasto di prima generazione. In uno studio del 2004, Fukuta et al hanno valutato la vascolarizzazione ed il flusso intraparenchimale di tumori stromali

gastrointestinali: l'entità della vascolarizzazione rilevata mediante angioecografia correlava con la densità vascolare e la conta mitotica riscontrate all'esame istologico; secondo questi Autori un pattern contrastografico ipervascolare corrisponderebbe a neoplasie altamente aggressive (40). Okanoubu ha dimostrato l'esistenza di correlazioni statisticamente significative tra densità vascolare rilevata dall'angioecografia perfusionale e densità vascolare determinata da esame istologico (41).

Il pattern 1 descritto in questo lavoro, (omogenea e prolungata impregnazione del SonoVue) riscontrato nella maggior parte dei pazienti portatori di gastrite acuta, potrebbe riflettere l'aumentata perfusione della parete gastrica impegnata da flogosi, in accordo con le osservazioni pubblicate da altri Autori riguardo al comportamento contrastografico di anse intestinali infiammate (morbo di Crohn in particolare). Solo 2 pazienti con gastrite acuta hanno progressivamente dismesso il mezzo di contrasto (pattern 2) e peraltro ciò si è verificato con andamento lento e omogeneo. Il pattern 3 (rapido enhancement e precoce dismissal) è prevalso nei soggetti con adenocarcinoma: probabilmente la ricca vascolarizzazione del tessuto neoplastico e la prevalenza di vasi di tipo arterioso può spiegare tale dinamica di distribuzione del SonoVue. Tre pazienti portatori di adenocarcinoma hanno presentato, invece, un comportamneto contrastografico differente (pattern 4: rapida impregnazione e lenta dismissal). Sono necessari campioni di popolazione più numerosi e, verosimilmente valutazioni dei prelievi istologici, per poter dare una valida interpretazione a questi risultati.

In effetti, i limiti di questo studio risiedono nel mancato confronto tra vascolarizzazione “percepita” dalle metodiche ecografiche e stima della densità vascolare all’esame istologico. A nostro parere, comunque, il dato istologico “densità vascolare” può non riflettere il comportamento funzionale di un sistema vascolare, in quanto non ne esprime le intrinseche caratteristiche dinamiche. In aggiunta, la tecnica di immuno-fluorescenza impiegata per determinare la densità vascolare di un campione istologico si basa sulla conta dei segnali provenienti dalla parete vascolare e pertanto non distingue tra capillari e vasi di calibro maggiore né riflette i relativi volumi di flusso.

Un altro limite di questo lavoro risiede nella mancata quantificazione dei rilievi Doppler ed angioecografici. Le valutazioni esposte sono invece di tipo osservazionale e non sono state eseguite analisi quantitative dei segnali vascolari repertati. Peraltro, il flusso rilevato con Color-Power Doppler non è stato confermato azionando la funzione Doppler pulsato. La spettrometria di flusso, e la conseguente valutazione di parametri quantitativi (velocità di flusso, volume di flusso...) e semiquantitativi (indice di resistenza, indice di pulsatilità) avrebbe probabilmente aggiunto ulteriori utili informazioni. In precedenti studi, i rilievi Doppler sono stati quantificati utilizzando parametri indicizzati (rapporto tra il numero di pixel colore per area di tessuto studiata e numero totale di pixel di quella stessa area) e i pattern contrastografici sono stati analizzati secondo curve cinetiche di riempimento, che descrivono l’intensità del segnale in rapporto al tempo (37). In effetti esistono in commercio software dedicati in grado di quantificare le cinetiche di riempimento: tali sistemi quantificano il tempo di picco di enhancement e la media di transit-time

delle microbolle, riportando una esatta stima della perfusione. Purtroppo la strumentazione di cui disponevamo non comprendeva questi sofisticati programmi di calcolo.

Probabilmente sarebbe stato utile valutare il comportamento contrastografico della parete gastrica di soggetti normali, ma non abbiamo ritenuto opportuno eseguire tale indagine considerato che la metodica richiede l'infusione di mezzo di contrasto endovenoso.

Inoltre, la tecnica angioecografica richiede una considerevole esperienza e senza dubbio l'esiguità della popolazione osservata e i brevi tempi di pratica della metodica da parte nostra non rispondono a tale requisito. Peraltro, sulla base delle nostre conoscenze, questo è il primo studio che descrive le modalità di impregnazione di un mezzo di contrasto di seconda generazione nell'adenocarcinoma gastrico e pertanto non è possibile confrontare la nostra esperienza con osservazioni analoghe.

In conclusione possiamo affermare che l'angioecografia perfusionale può fornire elementi utili di diagnosi differenziale; il riscontro di un ispessimento della parete gastrica è frequente nella pratica ecografica ed in questi casi, il rilievo di intensi e numerosi segnali Doppler e di un pattern contrastografico di tipo 3 (rapida impregnazione e veloce dismissal del mezzo di contrasto) può sollevare il sospetto di cancro gastrico. Pur non potendosi sostituire in nessun caso ad indagini di prima scelta quali l'endoscopia e la radiologia, l'ultrasonografia acquista tuttavia un ruolo di grande rilievo nella panoramica della diagnostica del tratto gastro-enterico. La vascolarizzazione del tumore, valutata con color-power-Doppler, è correlata alla neoangiogenesi, alla sua invasività ed al rischio di metastasi. Pertanto, l'osservazione di un'elevata vascolarizzazione della massa

tumorale con ecografia con mezzo di contrasto può rappresentare un indice prognostico sfavorevole nei pazienti con cancro gastrico in fase avanzata. La possibilità di stimare con accuratezza la vascolarizzazione e la neoangiogenesi mediante angioecografia perfusionale potrebbe fornire informazioni utili per orientare le decisioni terapeutiche, pianificare la chemioterapia e la terapia antiangiogenetica dei tumori gastrici. Riconoscere microvasi neoangiogenetici potrebbe significare identificare precocemente lesioni potenzialmente metastatiche. Attraenti progetti ipotizzano l'incorporazione di farmaci antitumorali alle microbolle, che possono essere facilmente distrutte impiegando alti indici meccanici al fine liberare il farmaco veicolato nella sede da trattare.

L'angioecografia perfusionale è sicuramente uno strumento promettente per la valutazione delle alterazioni del microcircolo in pazienti con infiammazione o neoplasia gastrica. Considerando inoltre, la non invasività, la praticità e la sicurezza di questa metodica, possiamo affermare che l'ecografia con mezzo di contrasto endovenoso detiene grandi potenzialità per utili applicazioni cliniche.

Ulteriori studi sono necessari per supportare questi dati e determinare l'effettiva utilità dell'ecografia con mezzo di contrasto per consentire la diagnosi differenziale tra gastrite acuta ed adenocarcinoma gastrico, per eseguire valutazioni prognostiche, per pianificare l'iter diagnostico-terapeutico più appropriato e valutare l'efficacia di un trattamento.

Bibliografia

1. Wilson S.R: The gastrointestinal tract. In Rumack C.M., Wilson S.R., Charboneau J.W. Diagnostica ultrasound: 269-320. Elsevier Mosby, St. Louis, 2005.
2. Folvik G et al: Hydrosonography of the small intestine: comparison with radiologic barium study, Scand J Gastroenterol 1999; 34: 1247-1252.
3. Ophir et al. Contrast agent in diagnostic ultrasound. Ultrasound Med Biol 1989; 15: 319-33.
4. Limberg B. Diagnosis and staging of colonic tumors by conventional abdominal sonography as compared with hydrocolonic sonography. N Engl J Med 1992; 327: 65-9.
5. Parente F et al. Modern imaging of Crohn's disease using bowel ultrasound. Inflamm Bowel Dis. 2004; 10: 452-461.
6. Gritzmann N et al. Transabdominal sonography of the gastrointestinal tract. Eur Radiol 2002; 12: 1748-61.
7. Fraquelli M. et al. Role of US in detection of Crohn disease. Radiology 2005; 236: 95-101.
8. Dubbins PA. Ultrasound demonstration of bowel wall thickness in inflammatory bowel disease. Clin Radiol 1984; 35: 227-31.
9. Wells PNT. Instrumentation including color flow imaging. Clinical Application of Doppler Ultrasound. New York: Raven Press; 1995: 19-33.

10. Bolondi et al. Changes in splanchnic hemodynamics in inflammatory bowel disease: non invasive assessment by Doppler ultrasound flowmetry. *Scand J Gastroenterol*; 1992
11. Spalinger et al. Doppler US in patients with Crohn disease: vessel density in the diseased bowel reflects disease activity. *Radiology* 2000.
12. Esteban et al. Activity of Crohn disease assessed by color Doppler ultrasound analysis of the affected loops. *Eur Radiol* 2001
13. Mori et al. Vascular compromise in chronic volvulus with midgut malrotation *Pediat Radiol* 1987.
14. Quillin et al. Appendicitis: efficacy of color Doppler sonography. *Radiology* 1994.
15. Hata et al. Evaluation of bowel wall ischemia with contrast-enhanced US: initial experience. *Radiology* 2005.
16. Arienti et al. Doppler ultrasonographic evaluation of splanchnic blood flow in coeliac disease. *Gut* 1996.
17. Chen CN et al. Color Doppler vascularity index can predict distant metastasis and survival in colon cancer patients. *Cancer Res* 2000; 60: 2892-97.
18. Chen CN et al. Association of Color Doppler Vascularity index and microvessel density with survival in patients with gastric cancer. *Ann Surg* 2002; 235: 512-18.
19. Fleisher AC. Sonographic depiction of tumor vascularity and flow: from in vivo models to clinical applications. *J Ultrasound Med* 2000; 19: 55-61.

20. Lassau N. Evaluation of contrast-enhanced color Doppler ultrasound for the quantification of angiogenesis in vivo. *Invest Radiol* 2001; 36: 50-55.
21. Folkman J. What is the evidence that tumor are angiogenesis dependent? *Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.
22. Fritzsche T. Preliminary results with a new liver specific ultrasound contrast agents. *Ultrasound Med Biol* 1994; Suppl 20: pS137.
23. Di Sabatino et al. Doppler enhancement after intravenous Levovist injection in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2002.
24. Rapaccini et al. Contrast-enhanced power Doppler of the intestinal wall in the evaluation of patients with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 2004
25. Serra et al. Ultrasound assessment of vascularization of the thickened terminal ileum wall in Crohn's disease patients using a low-mechanical index real-time scanning technique with a second generation ultrasound contrast agent. *Europ J Radiol* 2007
26. Robotti et al. Activity of Crohn disease: value of color Doppler sonography and contrast enhanced ultrasonography. *Abdom Imaging* 2004
27. Dietrich CF. Intestinal ultrasound in rare small and large intestinal diseases. *Z Gastroenterol* 1998; 36: 955-70
28. Quillin SP. Gastrointestinal inflammation in children: color Doppler ultrasonography. *J Ultrasound Med* 1994; 13: 751-756.
29. Jeffrey RB. Color Doppler Sonography of focal gastrointestinal lesions: initial clinical experience. *J Ultrasound Med* 1994; 13: 473-78.

30. Teehey et al. Bowel wall thickening: differentiation of inflammation from ischemia with color-Doppler and duplex US. *Radiology* 1996
31. Krix M. Comparison of intermittent-bolus contrast imaging with conventional Power Doppler sonography: quantification of tumor perfusion in small animals. *Ultrasound Med Biol* 2003; 29: 1093-1103.
32. Kawasaky T. Vascularity of advanced gastric carcinoma: evaluation by using power Doppler imaging.
33. Shilling MK. Evaluation of laser Doppler flowmetry for the study of benign and malignant gastric blood flow in vivo. *Gut* 1999; 45: 341-5.
34. Folkman J. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-27.
35. Paweletz N. Tumor related angiogenesis. *Crit Rew Oncol Hematol* 1989; 9: 197-242.
36. Fox SB. Angiogenesis: pathological, prognostic and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. *Lancet Oncol* 2001; 2: 278-89.
37. Delorme S. Quantitative characterization of color Doppler images: reproducibility, accuracy and limitations. *J Clin Ultrasound* 1995; 23: 537-550.
38. Gee MS. Doppler ultrasound imaging detects changes in tumor perfusion during antivascular therapy associated with vascular anatomic alterations. *Cancer Res* 2001; 61: 2974-2982.
39. Kuzuya T. Contrast-enhanced Ultrasonographic assessment of the response of Menetrier disease to *Helicobacter pylori* eradication therapy. *J Ultrasound Med* 2006; 25: 1099-1103.

40. Fukuta N. Estimation of the malignant potential of gastrointestinal stromal tumors: the value of contrast-enhanced coded phase-inversion harmonics US. *J Gastroenterol* 2005; 40: 247-255.
41. Okanobu H. Preoperative assessment of gastric cancer vascularity by flash echo imaging. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 608-12.